

PCT

WELTORGANISATION FÜR GEISTIGES EIGENTUM
Internationales Büro



INTERNATIONALE ANMELDUNG VERÖFFENTLICHT NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE
INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES PATENTWESENS (PCT)

(51) Internationale Patentklassifikation ⁶ : C12N 5/08		A2	(11) Internationale Veröffentlichungsnummer: WO 99/05262
			(43) Internationales Veröffentlichungsdatum: 4. Februar 1999 (04.02.99)
(21) Internationales Aktenzeichen: PCT/EP98/04613		(81) Bestimmungsstaaten: AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, CA, CH, CN, CU, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, GB, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MD, MG, MK, MN, MW, MX, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZW, ARIPO Patent (GH, GM, KE, LS, MW, SD, SZ, UG, ZW), eurasisches Patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), europäisches Patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE), OAPI Patent (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).	
(22) Internationales Anmeldedatum: 23. Juli 1998 (23.07.98)			
(30) Prioritätsdaten: 197 32 194.1 26. Juli 1997 (26.07.97) DE			
(71)(72) Anmelder und Erfinder: BEREITER-HAHN, Jürgen [DE/DE]; Liederbacherweg 21, D-65719 Hofheim (DE).			
(72) Erfinder; und			
(75) Erfinder/Anmelder (nur für US): BERND, August [DE/DE]; Kirchstrasse 22, D-55411 Bingen-Kempton (DE).			
(74) Anwalt: KEIL & SCHAAFHAUSEN; Eysseneckstrasse 31, D-60322 Frankfurt am Main (DE).			
		Veröffentlicht <i>Ohne internationalen Recherchenbericht und erneut zu veröffentlichen nach Erhalt des Berichts.</i>	
(54) Title: METHOD FOR OBTAINING AN EPITHELIAL CELL SHEET			
(54) Bezeichnung: VERFAHREN ZUR GEWINNUNG EINES EPITHELIALEN ZELLVERBANDES			
(57) Abstract			
The invention relates to a method for obtaining an epithelial cell sheet. In this method, a cell structure of human cutaneous tissue is subjected to mechanical stress in a culture medium.			
(57) Zusammenfassung			
Es wird ein Verfahren zur Gewinnung eines epithelialen Zellverbandes beschrieben, bei dem eine Zellkultur von humanem Hautgewebe in einem Kulturmedium einer mechanischen Beanspruchung ausgesetzt wird.			

Best Available Copy

LEDIGLICH ZUR INFORMATION

Codes zur Identifizierung von PCT-Vertragsstaaten auf den Kopfbögen der Schriften, die internationale Anmeldungen gemäss dem PCT veröffentlichen.

AL	Albanien	ES	Spanien	LS	Lesotho	SI	Slowenien
AM	Armenien	FI	Finnland	LT	Litauen	SK	Slowakei
AT	Österreich	FR	Frankreich	LU	Luxemburg	SN	Senegal
AU	Australien	GA	Gabun	LV	Lettland	SZ	Swasiland
AZ	Aserbaidshan	GB	Vereinigtes Königreich	MC	Monaco	TD	Tschad
BA	Boerrien-Herzegowina	GE	Georgien	MD	Republik Moldau	TG	Togo
BB	Barbados	GH	Ghana	MG	Madagaskar	TJ	Tadschikistan
BE	Belgien	GN	Guinea	MK	Die ehemalige jugoslawische Republik Mazedonien	TM	Turkmenistan
BF	Burkina Faso	GR	Griechenland	ML	Mali	TR	Türkei
BG	Bulgarien	HU	Ungarn	MN	Mongolei	TT	Trinidad und Tobago
BJ	Benin	IE	Irland	MR	Mauretanien	UA	Ukraine
BR	Brasilien	IL	Israel	MW	Malawi	UG	Uganda
BY	Belarus	IS	Island	MX	Mexiko	US	Vereinigte Staaten von Amerika
CA	Kanada	IT	Italien	NE	Niger	UZ	Usbekistan
CF	Zentralafrikanische Republik	JP	Japan	NL	Niederlande	VN	Vietnam
CG	Kongo	KE	Kenia	NO	Norwegen	YU	Jugoslawien
CH	Schweiz	KG	Kirgisistan	NZ	Neuseeland	ZW	Zimbabwe
CI	Côte d'Ivoire	KP	Demokratische Volksrepublik Korea	PL	Polen		
CM	Kamerun	KR	Republik Korea	PT	Portugal		
CN	China	KZ	Kasachstan	RO	Rumänien		
CU	Kuba	LC	St. Lucia	RU	Russische Föderation		
CZ	Tschechische Republik	LI	Liechtenstein	SD	Sudan		
DE	Deutschland	LK	Sri Lanka	SE	Schweden		
DK	Dänemark	LR	Liberia	SG	Singapur		
EE	Estland						

5 Verfahren zur Gewinnung eines epithelialen Zellverbandes

10 Gegenstand der Erfindung ist ein Verfahren zur Gewinnung eines epithelialen Zellverbandes, das den Zeitaufwand für die Züchtung humaner Haut- und Epidermistransplantate erheblich vermindert.

15 Es ist bekannt, daß bei ausgedehnten Hautdefekten oder schwer heilenden Wunden, z.B. großflächigen Verbrennungen oder chronischen Ulcera gute Behandlungserfolge mit autologen Transplantaten erzielt werden können. Hierbei werden dem Patienten gesunde Hautareale entnommen und auf das Wundgebiet
20 desselben Patienten verpflanzt. Diese Verfahrensweise hat den Vorteil, daß die übertragene Hautfläche vom Organismus nicht abgestoßen wird. Die dem Patienten entnommenen gesunden Hautstücke sind allerdings in der Regel viel zu klein, um die defekten Hautpartien vollständig überdecken zu können.

25 Es sind deshalb auch schon Verfahren entwickelt worden, mit denen die dem Patienten entnommenen Hautstücke und die in ihnen enthaltenen Keratinozyten, Melanozyten und Fibroblasten in einer Zellkultur vermehrt werden können. Dieser als
30 Expansion der Zellen bezeichnete Vorgang wird zweckmäßigerweise so durchgeführt, daß die in der Kultur gezüchteten Epidermiszellen anschließend auf ein Trägermaterial aufgebracht werden, dort anwachsen und mit diesem Trägermaterial entweder transplantiert oder nach enzymatischer Ablösung von

dem Trägermaterial als mehrschichtiger, konfluenter Zellrasen auf die Wunden aufgetragen werden.

5 So ist es aus dem Jpn. J. Cancer Res. 82, 1991, S. 553-558 bekannt, Epithelzellen in Kollagengelen zu kultivieren. Dabei werden die Zellen zunächst als Monolayer-Kulturen gehalten und dann in eine Kollagen-Kultur übertragen, die mit einem serumfreien Medium überströmt wird. Insbesondere unter dem Einfluß lactogener Hormone wird dann eine morphologische
10 Ausgestaltung des Zellverbandes festgestellt.

Der derzeitige Stand der Technik auf dem Gebiet der Hautkulturen zur Erzeugung von transplantationsfähigem Gewebe wird in der Veröffentlichung von H.O. Rennekampff, V. Kiessig, J.F. Hansbrough: Current concepts in the development of cultured
15 skin replacements. Journal of Surgical Research 62:288-295 (1996) zusammenfassend beschrieben. Auch in Römpp Lexikon Biotechnologie, Georg Thieme Verlag Stuttgart, New York, 1992 wird im Abschnitt "Tierzellkulturen" beschrieben, daß zur
20 Gewinnung von Gewebekulturen zunächst eine Primärkultur in Rollerflaschen gezüchtet und dann zur Vergrößerung der Aufwuchsfläche auf Mikrocarriern kultiviert wird, um zusammenhängende Zellverbände zu erhalten.

25 Die bisher entwickelten Verfahren sind jedoch noch mit erheblichen Nachteilen verbunden. Vor allem ist die Wachstumsgeschwindigkeit der Keratinozyten und auch die der Fibroblasten noch recht gering. Die Zeitdauer zwischen der Entnahme des Zellmaterials und der Transplantation der autologen,
30 expandierten Zellen sollte natürlich so kurz als möglich sein, weil erst nach erfolgter Transplantation der Heilungsprozess beginnen kann.

Ein weiteres Problem besteht darin, eine ausreichende Adhäsion
35 der Zellen an einem artifiziellen Substrat zu erreichen. Die

Adhäsion ist mitbestimmend für die Proliferationsgeschwindigkeit der Zellen und ist eine Voraussetzung für eine erfolgreiche Übertragung der Zellen aus der Kultur auf eine Wundfläche. Die Adhäsion kann zwar durch die Verwendung von "Feeder-layer-Fibroblasten" verbessert werden, jedoch erhöhen diese die Gefahr einer Abstoßung des Transplantats, so daß sie nach Möglichkeit nicht eingesetzt werden.

Schwierigkeiten bei der Transplantation können auch dadurch entstehen, daß der auf einem artifiziellen Substrat gezüchtete epitheliale Zellverband nach seinem enzymatischen Ablösen von dem Substrat Veränderungen der Zelloberflächen zeigt, durch die die Haftung des Transplantats auf dem Wundgewebe beeinträchtigt wird.

Schließlich besteht auch die Gefahr, daß der auf dem Substrat herangewachsene epitheliale Zellverband nach Ablösung von seiner festen Grundlage schrumpft. Dieses Problem kann derzeit nur durch Aussäen von Zellsuspensionen auf biologisch abbaubaren Trägermaterialien gelöst werden.

Es stellte sich deshalb die Aufgabe, die bisher bekannten Verfahren zur Gewinnung von transplantationsfähigen Zellen menschlicher Haut zu verbessern und insbesondere zu beschleunigen.

Gelöst wird diese Aufgabe durch ein Verfahren zur Gewinnung eines epithelialen Zellverbandes, bei dem eine Zellkultur von humanem Hautgewebe nach mehrtägiger Behandlung in einem Kulturmedium auf eine biologisch abbaubare Matrix, in der Fibroblasten enthalten sind, übertragen und einer mechanischen Beanspruchung ausgesetzt wird, bis die Matrixoberfläche mit einem zusammenhängenden, epithelialen Zellverband bedeckt ist.

Das für die Zellkultur verwendete humane Hautgewebe besteht aus Epithelzellen der Epidermis, also aus Keratinozyten, Melanozyten und Fibroblasten, die der Epidermis oder der Haut des Patienten entnommen und unter Zellkulturbedingungen vermehrt werden. Erfindungsgemäß wird das Wachstum des Zellverbandes durch das Einwirken mechanischer Reize wie Druck, Streckung, Stauchung oder das Einwirken von Scherkräften erheblich beschleunigt. Besonders günstige Ergebnisse werden erzielt, wenn die mechanische Beanspruchung durch Scherkräfte hervorgerufen wird, die beim Überströmen der Zellkulturen mit Kulturmedium erzeugt werden.

Die Einwirkung mechanischer Kräfte auf die Zellkultur erhöht nicht nur die Proliferationsaktivität der Zellen sondern steigert auch die mechanische Festigkeit der Zellschichten und stimuliert deren Differenzierung. Dadurch wird die Ausbildung mehrschichtiger Epithelien ermöglicht. Fehlt es an dem mechanischen Reiz, entwickeln sich vorwiegend ein- oder zweischichtige Epithelien und die Zeitdauer zwischen dem Aussäen der Zellen und deren Heranwachsen zu einem transplantationsfähigen Zellrasen ist deutlich länger. Obwohl bei der dermatologischen Wundbehandlung stets mit autologen, epithelialen Zellverbänden gearbeitet wird, kann die durch eine mechanische Beanspruchung erzielbare Förderung der Proliferationsgeschwindigkeit und der Gewebedifferenzierung auch an der in Forschungslaboratorien häufig eingesetzten humanen Epidermiszelllinie (HaCaT) gezeigt werden. Setzt man eine Kultur derartiger menschlicher Epidermiszellen durch Überströmen mit einem Kulturmedium einem Scherstress von etwa 0,5 bis 3 dyn.cm⁻² aus, dann beschleunigt sich innerhalb der ersten Tage der Behandlung die Proliferationsgeschwindigkeit etwa um das Vierfache gegenüber Kulturen auf demselben Substrat oder in demselben Medium, die in einer Plastikschiene keiner mechanischen Beanspruchung ausgesetzt sind.

Die einzige beigefügte Zeichnung (Fig. 1) zeigt, wie sich unter diesen Bedingungen die das Keratinozytenwachstum kennzeichnende Zellzahl ohne mechanische Reizung und mit mechanischer Reizung über einen Zeitraum von drei Wochen erhöht. Die dabei zwischen dem neunten und zwölften Tag eintretende Zellzahlverringerung ist dadurch zu erklären, daß in dieser Phase ein Zelldifferenzierungsschub stattfindet, durch den die Anzahl der Zellen reduziert wird.

Gleichzeitig mit dem Wachstum des Zellverbandes wird auch die Menge der Adhäsionsmoleküle signifikant erhöht. Die Erhöhung der Proliferationsgeschwindigkeit und die Vermehrung der Adhäsionsmoleküle verlaufen also parallel. Beide Effekte werden durch die Einwirkung der Scherkräfte hervorgerufen. Neben den Scherkräften ist hierfür aber auch die Vermeidung von Diffusionsschichten und damit eine verbesserte Nährstoffversorgung als Folge der ständigen Bewegung verantwortlich zu machen. Ähnliche Ergebnisse werden durch das zyklische Strecken der Kulturen erreicht.

In der dermatologischen Praxis werden zur Gewinnung von transplantationsfähigen Zellverbänden zunächst kleine Hautareale einem Patienten entnommen und hieraus nach an sich bekannten Verfahren eine Suspension von Keratinozyten, Melanozyten und/oder Fibroblasten gewonnen. Diese werden entweder in Plastikzellkulturschalen oder auf einer verformbaren Matrix ausgesät, mit einem handelsüblichen, für Epidermiszellen geeigneten Kulturmedium überschichtet und so zur Vermehrung gebracht. Die Kulturen werden dann über einen Zeitraum von 4 bis 6 Tagen zyklischen Bewegungen des Kulturmediums ausgesetzt, dann erneut suspendiert und auf eine biologisch abbaubare Matrix übertragen, in der Fibroblasten enthalten sind. Die Matrix wird dann erneut einer mechanischen Reizung ausgesetzt, die das Wachstum der Zellen weiter anregt und zu einer Konfluenz der Zellen, d.h. zu einer vollständigen

Bedeckung der Matrixoberfläche mit Keratinozyten führt. Der dann entstandene Zellverband ist zur Transplantation auf den Empfänger geeignet.

5 Für die Gewinnung eines zur Transplantation geeigneten Zellverbandes reicht eine bloße Stimulierung der Zellproliferation nicht aus. Es muß auch dafür gesorgt werden, daß sich die gebildeten Zellen hinreichend differenzieren. Überraschenderweise konnte nun gezeigt werden, daß die Art der
10 mechanischen Beanspruchung Einfluß darauf hat, ob die Zellproliferation oder die Differenzierung der Zellen überwiegt. Es konnte beobachtet werden, daß unter dem Einfluß von mechanischem Druck die Zelldifferenzierung gegenüber der Zellproliferation begünstigt ist.

15

Ein besonders vorteilhaftes Verfahren zur Gewinnung von transplantationfähigen epithelialen Zellverbänden geht von einem biologisch abbaufähigen Material aus, auf dem die Keratinozyten und/oder Melanozyten wachsen. In dieses Material
20 sind dermale Fibroblasten eingebracht, die ihrerseits das Wachstum und die Differenzierung der Epidermis fördern und bereits vor der Transplantation beginnen, die künstliche Matrix durch natürliches extrazelluläres Material zu ersetzen. Eine derartige Kokultur führt bereits ohne mechanische Reizung
25 zu einer deutlichen Stimulierung des Wachstums und zur Vielschichtigkeit der Epidermiszellen. Wird eine derartige Kokultur jedoch einer mechanischen Beanspruchung ausgesetzt, so führt das zu einer Aktivierung der Fibroblasten und damit zu einer erheblichen Beschleunigung des Wachstums des
30 Zellverbandes.

Als biologisch abbaubare Materialien können unterschiedliche Substrate eingesetzt werden, u.a. auch Schichten oder Netzwerke aus künstlich hergestellten und vernetzten Polymeren
35 wie Hyaluronsäure, Poly-Milchsäure oder Polyurethan.

Die Gewinnung des epithelialen Zellverbandes kann in folgender Weise erfolgen:

Beispiele

5

Es werden zunächst kleine Hautproben aus unverletzten Hautbereichen des Patienten entnommen. Sodann werden nach üblichen Methoden die Keratinozyten und die Fibroblasten des Gewebes voneinander getrennt, die Keratinozyten in eine
10 6-Well Multischale übertragen und ihnen etwa sechs Stunden Zeit zur Anheftung gegeben. Die Kulturen werden dann vier bis sechs Tage auf einer Wippe behandelt.

15

Gleichzeitig werden die aus den entnommenen Hautproben gewonnenen Fibroblasten in einer 6-Well Multischale ausgesät und in gleicher Weise behandelt wie die Keratinozyten. Anschließend werden die Fibroblasten aus der Schale durch Trypsinisieren oder durch Einwirkung einer Ethylen-diamin-tetraessigsäure-Lösung (zur Bindung der Calciumionen)
20 herausgelöst und in eine biologisch abbaubare Matrix, z.B. ein Kollagengel oder eine andere Matrixstruktur, eingebracht. Das Gel wird zusammen mit den Fibroblasten in eine Silikon-gummikammer etwa 1 bis 2 mm hoch gegossen. Nach Verfestigung des Gels wird die Silikon-gummikammer zyklischen Streckungen
25 ausgesetzt. Die Streckungen betragen 5 bis 10% der ursprünglichen Länge der Silikonkammer. Die Dauer jedes Dehnzyklus beträgt 2 bis 10 Sekunden.

30

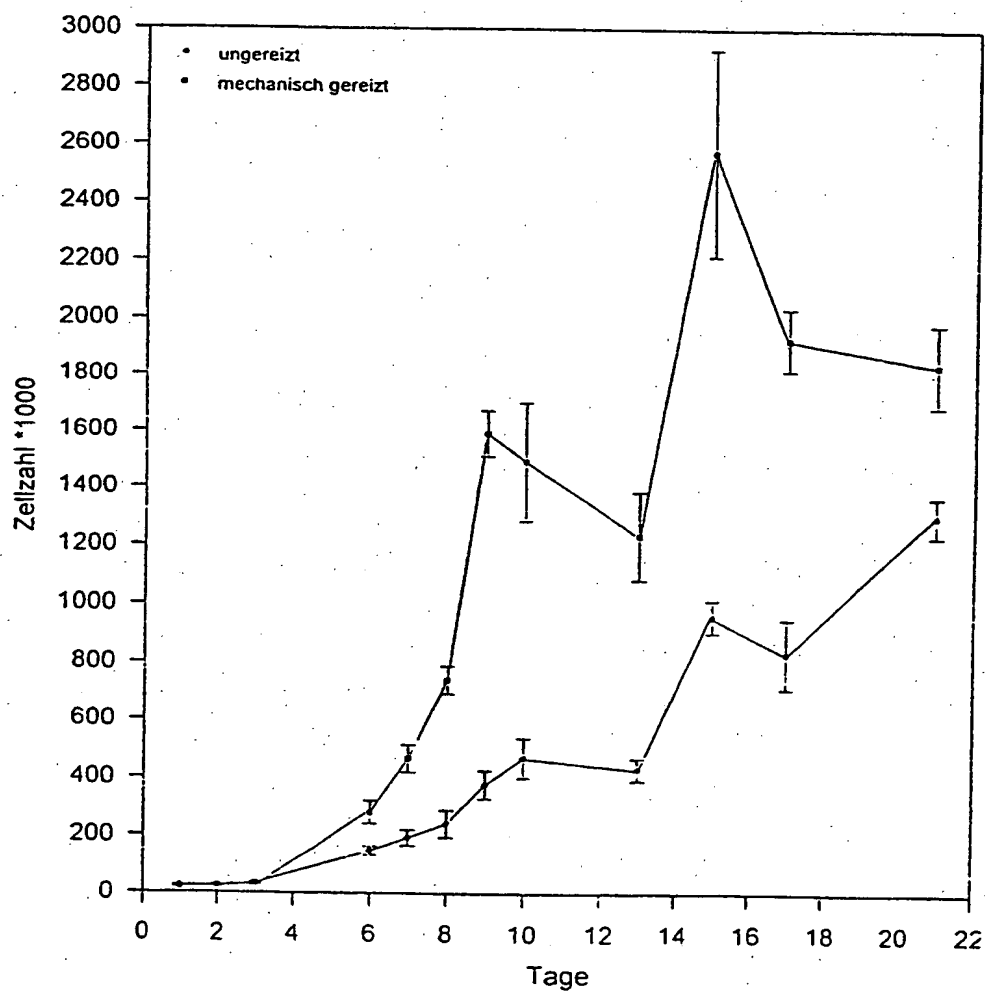
Anschließend wird die 4 bis 6 Tage auf einer Wippe behandelte
30 Kultur von Keratinozyten auf das Gel aufgebracht. Die Keratinozyten bilden dann eine homogene Zellschicht und dringen nicht in das Gel ein. Nach weiteren 5 bis 10 Tagen ist das Gesamtsystem bestehend aus Matrix mit Fibroblasten und dem darauf entstandenen, teilweise mehrschichtigen Keratinozyten-
35 belag transplantierfähig.

Patentansprüche:

- 5 1. Verfahren zur Gewinnung eines epithelialen Zellverbandes, dadurch gekennzeichnet, daß eine Zellkultur von humanem Hautgewebe nach mehrtägiger Behandlung in einem Kulturmedium auf eine biologisch abbaubare Matrix, in der Fibroblasten enthalten sind, übertragen und einer mechanischen Beanspruchung ausgesetzt wird, bis die Matrixoberfläche mit einem
10 zusammenhängenden, epithelialen Zellverband bedeckt ist.
2. Verfahren nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß die mechanische Beanspruchung durch Druck, Streckung,
15 Stauchung oder das Einwirken von Scherkräften erfolgt.
3. Verfahren nach Anspruch 1 oder 2, dadurch gekennzeichnet, daß die mechanische Beanspruchung durch Überströmen der Zellkultur mit dem Kulturmedium erfolgt.
20
4. Verfahren nach den Ansprüchen 1 bis 3, dadurch gekennzeichnet, daß als biologisch abbaubare Matrix Schichten oder Netzwerke künstlich hergestellter und vernetzter Polymerer von Hyaluronsäure, Polymilchsäure oder Polyurethan eingesetzt
25 werden.
5. Kokultur, dadurch gekennzeichnet, daß sie aus einer Fibroblasten enthaltenden, biologisch abbaubaren Matrix besteht, auf deren Oberfläche Keratinozyten und/oder Melanozyten kultiviert werden.
30
6. Epithelialer Zellverband, dadurch gekennzeichnet, daß er nach einem Verfahren der Ansprüche 1 bis 4 erhältlich ist.

FIG. 1

Wachstumskurve auf Kunststoff





PCTWELTORGANISATION FÜR GEISTIGES EIGENTUM
Internationales BüroINTERNATIONALE ANMELDUNG VERÖFFENTLICHT NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE
INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES PATENTWESENS (PCT)

(51) Internationale Patentklassifikation ⁶ : C12N 5/08	A3	(11) Internationale Veröffentlichungsnummer: WO 99/05262 (43) Internationales Veröffentlichungsdatum: 4. Februar 1999 (04.02.99)
(21) Internationales Aktenzeichen: PCT/EP98/04613 (22) Internationales Anmeldedatum: 23. Juli 1998 (23.07.98) (30) Prioritätsdaten: 197 32 194.1 26. Juli 1997 (26.07.97) DE (71)(72) Anmelder und Erfinder: BEREITER-HAHN, Jürgen [DE/DE]; Liederbacherweg 21, D-65719 Hofheim (DE). (72) Erfinder; und (75) Erfinder/Anmelder (nur für US): BERND, August [DE/DE]; Kirchstrasse 22, D-55411 Bingen-Kempton (DE). (74) Anwalt: KEIL & SCHAAFHAUSEN; Eysseneckstrasse 31, D-60322 Frankfurt am Main (DE).		(81) Bestimmungsstaaten: AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, CA, CH, CN, CU, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, GB, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MD, MG, MK, MN, MW, MX, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZW, ARIPO Patent (GH, GM, KE, LS, MW, SD, SZ, UG, ZW), eurasisches Patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), europäisches Patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE), OAPI Patent (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG). Veröffentlicht <i>Mit internationalem Recherchenbericht.</i> <i>Vor Ablauf der für Änderungen der Ansprüche zugelassenen Frist. Veröffentlichung wird wiederholt falls Änderungen eintreffen.</i> (88) Veröffentlichungsdatum des internationalen Recherchenberichts: 15. April 1999 (15.04.99)
(54) Title: METHOD FOR OBTAINING AN EPITHELIAL CELL SHEET (54) Bezeichnung: VERFAHREN ZUR GEWINNUNG EINES EPITHELIALEN ZELLVERBANDES (57) Abstract <p>The invention relates to a method for obtaining an epithelial cell sheet. In this method, a cell structure of human cutaneous tissue is subjected to mechanical stress in a culture medium.</p> (57) Zusammenfassung <p>Es wird ein Verfahren zur Gewinnung eines epithelialen Zellverbandes beschrieben, bei dem eine Zellkultur von humanem Hautgewebe in einem Kulturmedium einer mechanischen Beanspruchung ausgesetzt wird.</p>		

LEDIGLICH ZUR INFORMATION

Codes zur Identifizierung von PCT-Vertragsstaaten auf den Kopfbögen der Schriften, die internationale Anmeldungen gemäss dem PCT veröffentlichen.

AL	Albanien	ES	Spanien	LS	Lesotho	SI	Slowenien
AM	Armenien	FI	Finnland	LT	Litauen	SK	Slowakei
AT	Österreich	FR	Frankreich	LU	Luxemburg	SN	Senegal
AU	Australien	GA	Gabun	LV	Lettland	SZ	Swasiland
AZ	Aserbaidsschan	GB	Vereinigtes Königreich	MC	Monaco	TD	Tschad
BA	Bosnien-Herzegowina	GE	Georgien	MD	Republik Moldau	TG	Togo
BB	Barbados	GH	Ghana	MG	Madagaskar	TJ	Tadschikistan
BE	Belgien	GN	Guinea	MK	Die ehemalige jugoslawische Republik Mazedonien	TM	Turkmenistan
BF	Burkina Faso	GR	Griechenland	ML	Mali	TR	Türkei
BG	Bulgarien	HU	Ungarn	MN	Mongolei	TT	Trinidad und Tobago
BJ	Benin	IE	Irland	MR	Mauretanien	UA	Ukraine
BR	Brasilien	IL	Israel	MW	Malawi	UG	Uganda
BY	Belarus	IS	Island	MX	Mexiko	US	Vereinigte Staaten von Amerika
CA	Kanada	IT	Italien	NE	Niger	UZ	Usbekistan
CF	Zentralafrikanische Republik	JP	Japan	NL	Niederlande	VN	Vietnam
CG	Kongo	KE	Kenia	NO	Norwegen	YU	Jugoslawien
CH	Schweiz	KG	Kirgisistan	NZ	Neuseeland	ZW	Zimbabwe
CI	Côte d'Ivoire	KP	Demokratische Volksrepublik Korea	PL	Polen		
CM	Kamerun	KR	Republik Korea	PT	Portugal		
CN	China	KZ	Kasachstan	RO	Rumänien		
CU	Kuba	LC	St. Lucia	RU	Russische Föderation		
CZ	Tschechische Republik	LI	Licchtenstein	SD	Sudan		
DE	Deutschland	LK	Sri Lanka	SE	Schweden		
DK	Dänemark	LR	Liberia	SG	Singapur		
EE	Estland						

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Int. Application No.
PCT/EP 98/04613

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
IPC 6 C12N5/08

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)
IPC 6 C12N

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	I.A. SCHAFER ET AL.: "The interaction of human papillary and reticular fibroblasts and human keratinocytes in the contraction of the three dimensional floating collagen lattices" EXPREIMENTAL CELL RESEARCH, vol. 183, 1989, pages 112-125, XP002091896 *see the whole article*	1-6
X	L. SHAHABEDDIN ET AL.: "Characterization of skin reconstructed on a chitosan-linked collagen-glycosaminoglycan matrix" SKIN PHARMACOLOGY, vol. 3, 1990, pages 107-114, XP000673928 *see the whole article*	1-6
	-/--	

☒ Further documents are listed in the continuation of box C.

☐ Patent family members are listed in annex.

* Special categories of cited documents :

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier document but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

2 February 1999

Date of mailing of the international search report

16/02/1999

Name and mailing address of the ISA

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Marie, A

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Int. Application No
PCT/EP 98/04613

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	J.E.M. SOUREN ET AL.: "Contraction of collagen by human fibroblasts and keratinocytes" IN VITRO CELLULAR AND DEVELOPMENTAL BIOLOGY, vol. 25, no. 11, 1989, pages 1039-1045, XP002091897 *see the whole article*	1-6
X	M. LACROIX ET AL.: "Keratinocytes modulate the biosynthetic phenotype of dermal fibroblasts at a pretranslational level in a human skin equivalent" ARCH. DERMATOL. RES., vol. 287, 1995, pages 659-664, XP002091898 *see the whole article*	1-6
X	Y. KUROYANAGI ET AL.: "A cultured skin substitute composed of fibroblasts and keratinocytes with a collagen matrix: preliminary results of clinical trials" ANN. PLAST. SURG., vol. 31, 1993, pages 340-351, XP002091899 *see the whole article*	1-6
X	N.L. PARENTEAU ET AL.: "The organotypic culture of human skin keratinocytes and fibroblasts to achieve form and function" CYTOTECHNOLOGY, vol. 9, 1992, pages 163-171, XP002091900 *see the whole article*	1-6
X	G.J. BEUMER ET AL.: "The use of gas plasms treatment to improve the cell substrate properties of a skin substitute made of poly(ether)/poly(ester) copolymers" JOURNAL OF MATERIAL SCIENCE: MATERIAL IN MEDICINE, vol. 5, 1994, pages 1-6, XP002091901 *see the whole article*	1-6
X	T. MARUGUCHI ET AL.: "A new skin equivalent: keratinocytes proliferated and differentiated on collagen sponge containing fibroblasts" PLAST. RECONSTR. SURG., vol. 93, 1994, pages 537-544, XP002091902 *see the whole article*	1-6
	-/--	

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Inte Application No
PCT/EP 98/04613

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	C.J.M. NOLTE ET AL.: "Ultrastructural features of composite skin cultures grafted onto athymic mice" J. ANAT., vol. 185, no. Pt.2, 1994, pages 325-333, XP002091903 *see the whole article*	1-6
X	J.F. HANSBROUGH ET AL.: "Composite grafts of human keratinocytes grown on a polyglactin mesh-cultured fibroblast dermal substitute function as a bilayer skin replacement in full-thickness wounds on athymic mice" J. BURN CARE REHABIL., vol. 14, 1993, pages 485-494, XP002091904 *see the whole article*	1-6
X	S. KIPPENBERGER ET AL.: "Transcription of melanogenesis enzymes in melanocytes: dependence upon culture conditions and co-cultivation with keratinocytes." PIGMENT CELL RES., vol. 9, 1996, pages 179-184, XP002091905 *see the whole article*	1-6
X	N. YASU ET AL.: "Mechanical stress regulates the proliferation and differentiation of HPLF" J. DENT. RES., vol. 70, no. Spec. issue April, 1991, pages 589-abstract 2589, XP002091906 *see the whole abstract*	1-6
X	G.A. TANNER ET AL.: "An in vitro test of the cell stretch-proliferation hypothesis of renal cyst enlargement" J. AM. SOC. NEPHROL., vol. 6, 1995, pages 1230-1241, XP002091907 *see the whole article*	1-6
X	M.K. JAIN ET AL.: "Mechanical stress and cellular metabolism in living soft tissue composites" BIOMATERIALS, vol. 11, 1990, pages 465-472, XP002091908 *see the whole article*	1-6
X	F.E. GÖRMAR ET AL.: "A new model of epidermal differentiation: induction by mechanical stimulation" ARCH. DERM.RES., vol. 282, 1990, pages 22-32, XP002091909 *see the whole article*	1-6
	-/--	

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Inte Application No

PCT/EP 98/04613

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	Y-C. LIN ET AL.: "Decreased level of PDGF-stimulated receptor autophosphorylation by fibroblasts in mechanically relaxed collagen matrices" JOURNAL OF CELL BIOLOGY, vol. 122, no. 3, 1993, pages 663-672, XP002091910 *see the whole article*	1-6
X	J. ZOLLER ET AL.: "An easy-to-use device for the application of mechanical stress on cells in tissue culture" EUROPEAN JOURNAL OF CELL BIOLOGY, vol. 69, no. suppl. 42, 1996, page 158 XP002091911 *see the whole abstract* -----	1-6

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Inte Aktenzeichen

PCT/EP 98/04613

A. KLASSIFIZIERUNG DES ANMELDUNGSGEGENSTANDES
IPK 6 C12N5/08

Nach der Internationalen Patentklassifikation (IPK) oder nach der nationalen Klassifikation und der IPK

B. RECHERCHIERTE GEBIETE

Recherchierter Mindestprüfstoff (Klassifikationssystem und Klassifikationssymbole)

IPK 6 C12N

Recherchierte aber nicht zum Mindestprüfstoff gehörende Veröffentlichungen, soweit diese unter die recherchierten Gebiete fallen

Während der internationalen Recherche konsultierte elektronische Datenbank (Name der Datenbank und evtl. verwendete Suchbegriffe)

C. ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
X	I.A. SCHAFFER ET AL.: "The interaction of human papillary and reticular fibroblasts and human keratinocytes in the contraction of the three dimensional floating collagen lattices" EXPREIMENTAL CELL RESEARCH, Bd. 183, 1989, Seiten 112-125, XP002091896 *siehe den gesamten Artikel*	1-6
X	L. SHAHABEDDIN ET AL.: "Characterization of skin reconstructed on a chitosan-linked collagen-glycosaminoglycan matrix" SKIN PHARMACOLOGY, Bd. 3, 1990, Seiten 107-114, XP000673928 *siehe den gesamten Artikel*	1-6
	-/-	



Weitere Veröffentlichungen sind der Fortsetzung von Feld C zu entnehmen



Siehe Anhang Patentfamilie

* Besondere Kategorien von angegebenen Veröffentlichungen

"A" Veröffentlichung, die den allgemeinen Stand der Technik definiert, aber nicht als besonders bedeutsam anzusehen ist

"E" älteres Dokument, das jedoch erst am oder nach dem internationalen Anmeldedatum veröffentlicht worden ist

"L" Veröffentlichung, die geeignet ist, einen Prioritätsanspruch zweifelhaft erscheinen zu lassen, oder durch die das Veröffentlichungsdatum einer anderen im Recherchenbericht genannten Veröffentlichung belegt werden soll oder die aus einem anderen besonderen Grund angegeben ist (wie ausgeführt)

"O" Veröffentlichung, die sich auf eine mündliche Offenbarung, eine Benutzung, eine Ausstellung oder andere Maßnahmen bezieht

"P" Veröffentlichung, die vor dem internationalen Anmeldedatum, aber nach dem beanspruchten Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist

"T" Spätere Veröffentlichung, die nach dem internationalen Anmeldedatum oder dem Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist und mit der Anmeldung nicht kollidiert, sondern nur zum Verständnis des der Erfindung zugrundeliegenden Prinzips oder der ihr zugrundeliegenden Theorie angegeben ist

"X" Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann nicht als auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden

"Y" Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann nicht als auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden, wenn die Veröffentlichung mit einer oder mehreren anderen Veröffentlichungen dieser Kategorie in Verbindung gebracht wird und diese Verbindung für einen Fachmann naheliegend ist

"&" Veröffentlichung, die Mitglied derselben Patentfamilie ist

Datum des Abschlusses der internationalen Recherche

2. Februar 1999

Absenddatum des internationalen Recherchenberichts

16/02/1999

Name und Postanschrift der Internationalen Recherchenbehörde
Europäisches Patentamt, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
Fax: (+31-70) 340-3016

Bevollmächtigter Bediensteter

Marie, A

C.(Fortsetzung) ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
X	J.E.M. SOUREN ET AL.: "Contraction of collagen by human fibroblasts and keratinocytes" IN VITRO CELLULAR AND DEVELOPMENTAL BIOLOGY, Bd. 25, Nr. 11, 1989, Seiten 1039-1045, XP002091897 *siehe den gesamten Artikel*	1-6
X	M. LACROIX ET AL.: "Keratinocytes modulate the biosynthetic phenotype of dermal fibroblasts at a pretranslational level in a human skin equivalent" ARCH. DERMATOL. RES., Bd. 287, 1995, Seiten 659-664, XP002091898 *siehe den gesamten Artikel*	1-6
X	Y. KUROYANAGI ET AL.: "A cultured skin substitute composed of fibroblasts and keratinocytes with a collagen matrix: preliminary results of clinical trials" ANN. PLAST. SURG., Bd. 31, 1993, Seiten 340-351, XP002091899 *siehe den gesamten Artikel*	1-6
X	N.L. PARENTEAU ET AL.: "The organotypic culture of human skin keratinocytes and fibroblasts to achieve form and function" CYTOTECHNOLOGY, Bd. 9, 1992, Seiten 163-171, XP002091900 *siehe den gesamten Artikel*	1-6
X	G.J. BEUMER ET AL.: "The use of gas plasma treatment to improve the cell substrate properties of a skin substitute made of poly(ether)/poly(ester) copolymers" JOURNAL OF MATERIAL SCIENCE: MATERIAL IN MEDICINE, Bd. 5, 1994, Seiten 1-6, XP002091901 *siehe den gesamten Artikel*	1-6
X	T. MARUGUCHI ET AL.: "A new skin equivalent: keratinocytes proliferated and differentiated on collagen sponge containing fibroblasts" PLAST. RECONSTR. SURG., Bd. 93, 1994, Seiten 537-544, XP002091902 *siehe den gesamten Artikel*	1-6
	-/--	

C.(Fortsetzung) ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN		
Kategorie	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
X	C.J.M. NOLTE ET AL.: "Ultrastructural features of composite skin cultures grafted onto athymic mice" J. ANAT., Bd. 185, Nr. Pt.2, 1994, Seiten 325-333, XP002091903 *siehe den gesamten Artikel* ---	1-6
X	J.F. HANSBROUGH ET AL.: "Composite grafts of human keratinocytes grown on a polyglactin mesh-cultured fibroblast dermal substitute function as a bilayer skin replacement in full-thickness wounds on athymic mice" J. BURN CARE REHABIL., Bd. 14, 1993, Seiten 485-494, XP002091904 *siehe den gesamten Artikel* ---	1-6
X	S. KIPPENBERGER ET AL.: "Transcription of melanogenesis enzymes in melanocytes: dependence upon culture conditions and co-cultivation with keratinocytes" PIGMENT CELL RES., Bd. 9, 1996, Seiten 179-184, XP002091905 *siehe den gesamten Artikel* ---	1-6
X	N. YASU ET AL.: "Mechanical stress regulates the proliferation and differentiation of HPLF" J. DENT. RES., Bd. 70, Nr. Spec. issue April, 1991, Seiten 589-abstract 2589, XP002091906 *siehe die gesamte Zusammenfassung* ---	1-6
X	G.A. TANNER ET AL.: "An in vitro test of the cell stretch-proliferation hypothesis of renal cyst enlargement" J. AM. SOC. NEPHROL., Bd. 6, 1995, Seiten 1230-1241, XP002091907 *siehe den gesamten Artikel* ---	1-6
X	M.K. JAIN ET AL.: "Mechanical stress and cellular metabolism in living soft tissue composites" BIOMATERIALS, Bd. 11, 1990, Seiten 465-472, XP002091908 *siehe den gesamten Artikel* ---	1-6
X	F.E. GÖRMAR ET AL.: "A new model of epidermal differentiation: induction by mechanical stimulation" ARCH. DERM.RES., Bd. 282, 1990, Seiten 22-32, XP002091909 *siehe den gesamten Artikel* ---	1-6
	-/--	

INTERNATIONALER FORSCHUNGSBERICHT

Int. for. Zeichen

PCT/EP 98/04613

C.(Fortsetzung) ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
X	Y-C. LIN ET AL.: "Decreased level of PDGF-stimulated receptor autophosphorylation by fibroblasts in mechanically relaxed collagen matrices" JOURNAL OF CELL BIOLOGY, Bd. 122, Nr. 3, 1993, Seiten 663-672, XP002091910 *siehe den gesamten Artikel*	1-6
X	J. ZOLLER ET AL.: "An easy-to-use device for the application of mechanical stress on cells in tissue culture" EUROPEAN JOURNAL OF CELL BIOLOGY, Bd. 69, Nr. suppl. 42, 1996, Seite 158 XP002091911 *siehe die gesamte Zusammenfassung*	1-6

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning
Operations and is not part of the Official Record**

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- ☐ BLACK BORDERS
- ☐ IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- ☒ FADED TEXT OR DRAWING
- ☐ BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING
- ☐ SKEWED/SLANTED IMAGES
- ☐ COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS
- ☐ GRAY SCALE DOCUMENTS
- ☐ LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT
- ☐ REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY
- ☐ OTHER: _____

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.

THIS PAGE BLANK (USPTO)